

Valorisation des margines par production de lipases / A. Maroun ; sous la direction de Dr A. Bassal. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 5 (2004), pp. 295-309.

Bibliographie. Figures. Tableaux.

I. Huiles végétales. II. Industries huilières. III. Triglycérides.

Bassal, A.

PER L1049 / FA193886P

VALORISATION DES MARGINES PAR PRODUCTION DE LIPASES

A. MAROUN

*Université Saint-Esprit de Kaslik,
Faculté des Sciences Agronomiques*

B. P. 446 Jounieh, Liban

Sous la direction de Dr A. BASSAL

Institut des Recherches Agronomiques du Liban, Fanar

B. P. 90-1965 Jdeidet El-Metn, Liban

RÉSUMÉ

*Le but de cette étude est de valoriser les margines des huileries par fermentation avec la levure *Yarrowia lipolytica* afin de produire des lipases utilisables dans l'industrie agroalimentaire ou autres.*

*Les fermentations ont été effectuées dans un erlen meyer de 1 litre sur des volumes variables de margines à différents pH. Les résultats obtenus ont montré que la levure se développe mieux sur un volume de marge de 150 ml à pH 6. Dans ce milieu, la levure a la meilleure activité lipolytique (8,35 UL/ml). Au cours de son développement, *Yarrowia lipolytica* a assimilé quasiment tous les sucres et les lipides de la marge pour produire de la biomasse et de lipases.*

Pour déterminer la température et le pH optimaux de la lipase, un plan d'expérience factoriel à 3 niveaux a été effectué, les résultats obtenus ont montré que l'activité lipolytique maximale est obtenue à un pH de 6,75 et une température de 42,5°C.

L'analyse par l'HPLC des triglycérides des huiles d'olive et de soja attaquée par la lipase obtenue montre que cette dernière hydrolyse de préférence la trioleine et la di-oleil-linoleil du glycérol.

Mots clés : Margines, *Yarrowia lipolytica*, lipases, sucres, lipides, triglycérides.

ABSTRACT

*The aim of this study is to valorize the olive mill waste water (OMWW) by fermentation with *Yarrowia lipolytica* in order to produce lipases that can be used in the agro-food industry and others.*

*Fermentation was done in a 1 liter erlenmeyer containing various volumes of OMWW with different pH. The results showed that yeast grows better in a OMWW volume of 150 ml with pH 6. This is what guaranteed the yearn an optimal lipolytic activity (8.35 UL/ml). During its growth, *Yarrowia lipolytica* consumed almost all sugars and lipids of the OMWW to produce biomass and lipases.*

In order to determine the optimal temperature and pH of the lipase, a factorial experimental design was conducted and showed that maximum lipolytical activity is obtained at pH 6.75 with a temperature of 42.5°C.

Analysis by HPLC of the triglycerides contained in olive and soybean oil and that were attacked by this lipase showed that the latter preferably hydrolyses trioleine and oleil-linoeil of the glycerol.

Key words : olive mill waste water, *Yarrowia lipolytica*, lipases, sugars, lipids, triglyceride.

INTRODUCTION

La margine ou eau de végétation est le liquide résiduel obtenu au cours de l'extraction et la séparation de l'huile par centrifugation ou sédimentation de la pâte d'olive après pressage ou centrifugation (Gomez *et al.*, 1982).

Le Liban, un des pays méditerranéens producteur d'huile d'olive, est confronté à la problématique de l'élimination de ses eaux usées ou margines qui constituent annuellement 21000 à 42000 m³ (Ministère de l'Agriculture Libanais, 1999). Ces margines sont des eaux très polluantes. Leurs fortes charges organiques exigent une augmentation de leur DCO entraînant une eutrophisation des cours d'eaux (Krischna *et al.*, 2000, cité par Rohit *et al.*, 2001). Elles sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (phénols, acide gras volatiles, insecticides, etc) qu'elles contiennent (Dagga et Abu Bôhmer, 1993). L'épandage de ces effluents liquides (Lecomte, 1998) réduisent la qualité du sol et causent une pollution des nappes phréatiques situées dans la zone d'épandage ou à proximité de cette dernière (Mebirouk, 2000).

Une fermentation de ces margines par des levures permet de réduire la pollution par dégradation de la majorité des matières organiques et de diminuer le niveau du DCO avec production de biomasse (riche en protéines unicellulaires) et des enzymes (De Felice *et al.*, 1997).

La levure *Yarrowia lipolytica* dérivant d'une souche sauvage est une levure non-pathogène dont la température optimale de croissance est aux alentours de 29°C (Barth et Gaillardin, 1996, cité par Perez -Campos and Dominguez, 2001), elle a été retenue pour sa meilleure croissance et sa production des lipases industrielles à partir des margines (Scioli et De Felice, 1993).

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases E.C. 3.1.13) sont des enzymes industrielles capables d'hydrolyser les liaisons esters des triglycérides (Isono *et al.*, 1995). Elles occupent une des plus importantes classes dans la bio-industrie enzymatique et sont utilisées dans la production des détergents (Falch, 1991), des produits cosmétiques (Macrae *et al.*, 1990, cité par Rohit *et al.* 2001), des médicaments (Ghosh *et al.*, 1996) et des renchérissements des aliments (Gandhi, 1997, cité par Rohit *et al.*, 2001).

Le but de cette étude est de valoriser les margines des huileries d'olives par voie biotechnologique avec la levure *Yarrowia lipolytica* afin de produire de lipases.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les margines ont été caractérisées avant et après fermentation. Les sucres ont été déterminés par HPLC (Shimadzu LC-10AD) en utilisant une colonne Supelco LC-NH₂ (25 cm * 4,6 cm ; 5µm) et un détecteur RID-10A Shimadzu, les lipides par la méthode de « Blight & Dyer » et l'azote par la méthode de Kjeldal.

La fermentation est effectuée dans un erlen meyer de 1 litre contenant : 150 ml de margine filtrée, 0,6 % de sulfate d'ammonium, 0,1 % de l'extrait de levure et 2 à 3 colonies de *Yarrowia lipolytica* prise d'un milieu solide. Le milieu de culture est agité à 160 tours/min dans un incubateur à 27°C ± 1°C durant 120 heures. La courbe de croissance de la levure a été effectuée avec des dilutions logarithmiques par le NaCl (0,85%) de la margine fermentée et ensemencement sur un milieu solide YDA, permettant ainsi de compter les colonies formées et de suivre la progression de la croissance cellulaire de *Yarrowia lipolytica*.

La teneur en matières sèches a été déterminée par gravimétrie. Un volume de margine est filtré sur une membrane de 0,45 µm séchée et tarée auparavant.

La membrane est ensuite lavée avec de l'eau distillée et séchée à l'étuve (105°C) pendant 24 heures. Les masses de la membrane avant et après séchage sont déterminées à l'aide d'une balance analytique.

La mesure de l'activité lipolytique a été effectuée, selon la méthode de Nagaoka *et al.* (1969) cité par Paquot *et al.*, (1996), sur une émulsion composée de 25 ml d'huile d'olive neutre avec 75 ml de gomme arabique (0,5 %), et homogénéisée à l'aide d'un mixer ultra-turax pendant 2 minutes. Le milieu réactionnel est constitué de : 5 ml de l'émulsion d'huile d'olive avec 4 ml d'une solution tampon de phosphate (0,1 M) à pH 7 et de 1 ml de milieu de fermentation. Le mélange est incubé à 37°C dans un bain-marie pendant 10 minutes, la réaction est stoppée par addition de 20 ml d'acétone-éthanol (1 :1 v/v), 2 gouttes de phénol phtaléine (0,01%) (pH 7 - 8,5) sont ensuite ajoutées et le mélange est titré par une solution de NaOH (50 mM). L'unité lipasique (UL) est égale à 1 micromole d'acide gras libre/ minute.

La caractérisation de la lipase a été déterminée par la recherche de sa température et son pH optimaux, suivant un plan d'expérience factoriel à 3 niveaux (Tab. 1).

Tableau 1 : Plan d'expérience factoriel.

Niveau Facteurs	-1	0	+1
T°C	25	35	45
pH	4	6	8

Lors de cette caractérisation, l'indicateur coloré a été choisi en fonction du niveau du pH étudié :

- Vert de bromocresol (pH 3,6 – 5,4)
- Bleu de bromothymol (pH 6,0 – 7,6)
- Rouge de chlorophénol (pH 4,2 – 6,4)
- Rouge de phénol (pH 6,8 – 8,4).

La recherche de la spécificité de l'enzyme vis-à-vis des triglycérides a été effectuée en incubant l'enzyme avec de l'huile d'olive et de soja à 40°C durant 24 h. Les triglycérides de ces deux huiles ont été déterminés avant et après hydrolyse par HPLC sur une phase inverse (Supelcosil LC-18 ; 25cm * 4,6 mm ; 5 µm), en utilisant une phase mobile composée d'acétone et d'acétonitrile (60 : 40) à un débit de 1,5 ml/minute. Le détecteur utilisé est à indice de réfraction différentiel (RID-10A Shimadzu).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'influence de la composition des margines sur la courbe de croissance

La courbe de croissance de la levure (Fig. 1) cultivée sur 150 ml de margine filtrée dans un erlen meyer de 1 litre de volume à pH 5 n'a pas une phase de latence, le déclenchement de la courbe de croissance débute par une phase de démarrage suivie d'une phase logarithmique, c'est la phase de croissance maximale d'une durée 12 h avec un taux spécifique de croissance $\mu_m = 0,02 \text{ h}^{-1}$.

Au cours de sa croissance, la levure a consommé quasiment tous les sucres (glucose et saccharose) et les lipides présents dans la margine (Tab. 2), ce qui réduit le pouvoir polluant de la margine. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Scioli et Vollaro (1997) et De Felice *et al.* (1997).

Une production de 6,1672 g/l de biomasse a été obtenue. Cette biomasse est réputée riche en protéines unicellulaires.

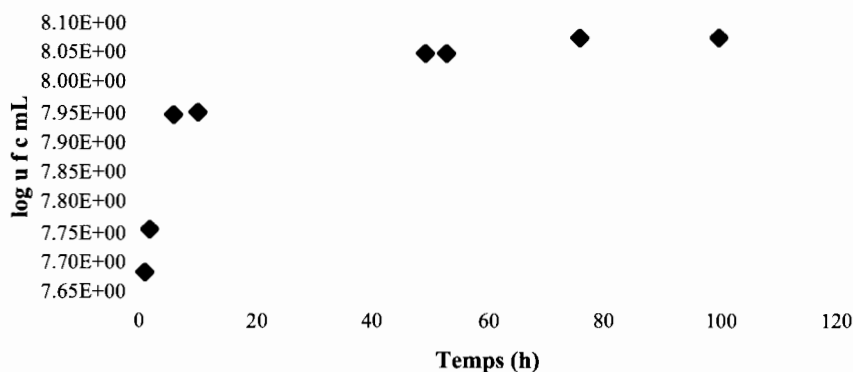


Figure 1. Courbe de croissance de *Yarrowia lipolytica* sur 150 ml de margine dans un volume de 1 litre à pH 5.

Tableau 2 : Variations des constituants de la margine (filtrée et non filtrée) avant et après fermentation.

	Margine filtrée					
	Sucres (g/L)			Lipide (g/l)	Azote (g/l)	Matière Sèche (g/l)
	Gluc.	Fruc.	Sacch.			
Avant Fermentation	23,24	0	1,26	17,235	0,688	1,8
Après Fermentation	0,3	0	0,60	0,053	---	7,9672

Le volume de la margine (Tab. 3) a présenté une influence significative sur le taux de croissance ($p < 0,05$), puisque dans les mêmes conditions à pH 5, la levure a montré une croissance accrue sur 240 ml de margine avec un taux de croissance $\mu_m = 0,061 \text{ h}^{-1}$ supérieur à celle sur 150 ml avec $\mu_m = 0,019 \text{ h}^{-1}$. Une diminution progressive de la concentration cellulaire de *Yarrowia lipolytica* dans un volume de 240 ml a été observée au cours de la fermentation, précisément après 24 heures, cela serait dû à un manque d' O_2 dissout pour la levure. *Yarrowia lipolytica* a un métabolisme respiratoire aérobie assuré par des conditions d'aération bien définies (Leveau et Bouix, 1993). Le volume 150 ml de margine a été adopté pour les différentes fermentations réalisées durant cette étude.

Tableau 3 : Taux de croissance maximaux de *Yarrowia lipolytica* en fonction du pH et du volume de milieu de culture.

Volume de margine (mL)	pH	Nombre d'essais	$\mu\text{m (h}^{-1}\text{)}$ moyenne	Ecart-type
150	5	3	0,019	0,0015
150	6	3	0,031	0,0035
240	5	3	0,061	0,00424

- Une influence significative ($p < 0,05$) du pH du milieu de culture sur le développement de la levure, a été remarquée. Dans les mêmes conditions sur un volume de 150 ml, le taux de croissance à pH 6 est meilleur qu'à pH 5, ce qui est en accord avec les résultats de Destain *et al.* (1997).

Production de lipases

La détermination de la quantité d'enzymes libérées par *Yarrowia lipolytica* sur une margine à pH initialement 6 a montré une phase d'augmentation de la quantité de lipases (Fig. 2) libérées (8,75 UL/ml) pendant 50 heures, ce qui est en accord avec Ota *al.* (1987, cité par Hadeball, 1991). Une diminution progressive après 60 heures a été remarquée correspondant à la phase de dégradation de l'enzyme libérée pendant la fermentation. Apparemment, la production des lipases est en corrélation avec la concentration des cellules produites durant la fermentation.

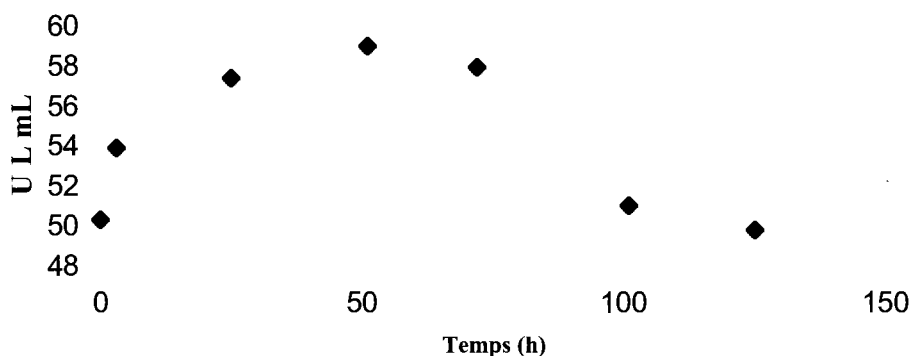


Figure 2. Quantité d'enzyme produite par *Yarrowia lipolytica* dans le milieu de culture à pH initialement 6.

Le pH du milieu de fermentation initial a présenté une influence significative ($p < 0,05$) sur la production de lipases, puisque dans les mêmes conditions sur un volume de 150 mL, la levure a produit à pH initial 6 une quantité plus importante de lipase (8,35 UL/ml) que sur celui à pH 5 (5,54 UL/ml). Donc, le milieu de culture à pH 6 est le meilleur pour une bonne prolifération de la levure avec une production des lipases, ce qui est en accord avec Scioli et Vollaro (1997).

- L'addition de l'ion Mg^{2+} sous forme de $MgSO_4$ (0,5 g/l) dans la culture à pH 6 initiale n'a pas présenté une influence significative sur l'augmentation de l'activité lipolytique, ce qui est en accord avec le résultat de Novotny et Dolezalova (1993) qui ont décrit dans leurs travaux de recherches que l'effet de l'ion Mg^{2+} sur la synthèse des lipases est fort dépendant de la nature des souches de *Yarrowia lipolytica*.

Caractérisation de la lipase

Les résultats obtenus du plan d'expérience sont récapitulés dans le modèle suivant :

$$ACT = -90,6771 + 1,00208 * T + 29,4635 * pH - 0,0325 * T^2 + 0,271875 * T * pH - 3,03125 * pH^2.$$

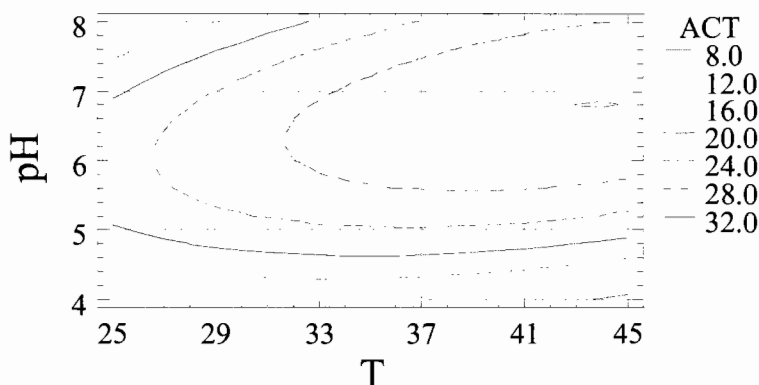


Figure 3. Les courbes iso-activités de la surface affectée par la lipase.

- Le couple optimal obtenu a un pH de 6,75 et une T de 42,5 °C (Fig. 3). Un essai de confirmation a été effectué, l'activité lipolytique obtenue est 32 UL/ml à un pH de 6,5 avec une T de 41,5°C.

- Les résultats obtenus par HPLC montre que l'enzyme a hydrolysé les triglycérides suivants : PLL, OOL, LnOP, PLP et OOO (Tab. 4) plus facilement que les autres triglycérides présents dans l'huile d'olive. Le même phénomène a été observé sur l'huile de soja, où la lipase attaque plus facilement les triglycérides suivant : LLL, OLLn , LLLn, LLO, OOL et OOO (Tab. 5). Des résultats similaires ont été trouvés par Hou (1997) en étudiant la spécificité des nouvelles lipases produites par les levures (*Yarrowia lipolytica* YB-423, 2178, 17056).

- La superficie du pic de "mono et de diglycérides" (Fig. 4, 5) au temps de rétention 5,2 minutes a augmenté suite à l'hydrolyse enzymatique de l'huile.

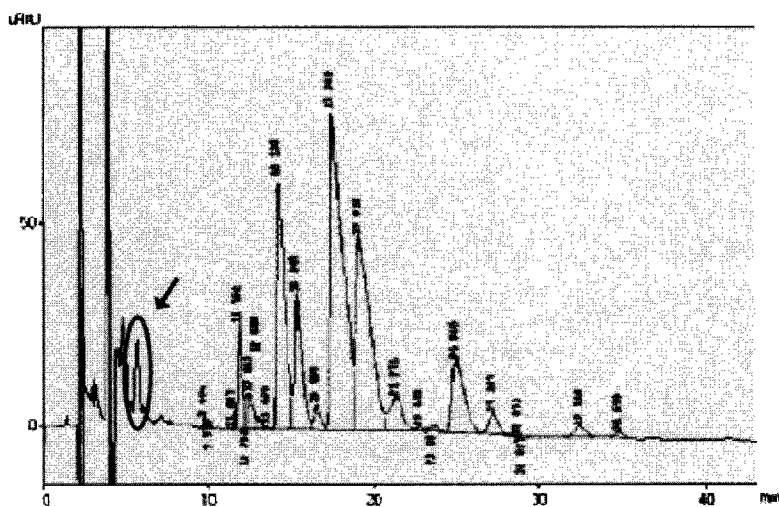


Figure 4. Chromatogramme des triglycérides dans l'huile d'olive avant l'attaque enzymatique

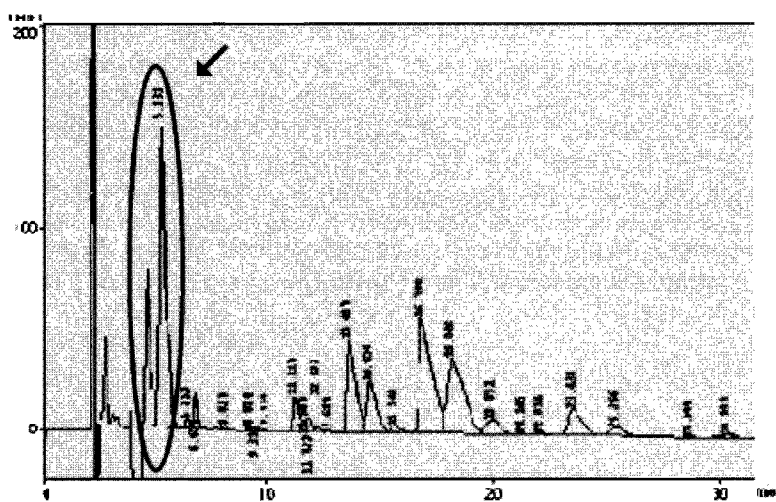


Figure 5. Chromatogramme des triglycérides dans l'huile d'olive attaquée par la lipase produite par *Yarrowia lipolytica* Durant 24 heures à 40°C.

Tableau 4 : Composition des triglycérides (%) de l'huile d'olive avant et après attaque enzymatique.

	Temps de rétention(min)	Avant enzyme	Après enzyme
LLL	9,696	0,2855	0,4236
OLLn	9,975	0,2989	0,3658
LLO	11,764	3,5755	3,5860
OOLn	12,253	0,8875	1,2845
PLL	12,462	1,3134	0,7985
LnOP	12,888	0,4829	0,4686
OOL	14,13	16,0592	15,8041
POL	15,247	8,5584	9,3284
PLP	16,458	1,2912	1,1909
OOO	17,362	32,8982	30,1657
POO	19,012	22,4187	23,5916
POP	21,271	3,5271	3,6723
SOO	24,865	6,6731	7,2021

Tableau 5 : Composition des triglycérides (%) de l'huile de soja avant et après attaque enzymatique.

	Temps de rétention(min)	Avant enzyme	Après enzyme
LLnLn	6,395	1,2411	1,3734
LLLn	7,333	7,4246	7,1911
LLL+ OLLn	8,403	23,5630	21,2686
PLLn	9,405	3,3954	3,67006
LLO	10,312	17,8449	17,6921
PLL	11,004	15,1677	16,1494
OOL	13,131	8,2530	7,8712
POL+SLL	13,831	12,5790	13,9520
PLP	15,064	2,0861	2,7175
OOO	16,997	2,7101	2,0331

(**L** = linoleique, **Ln** = linoléinique, **O** = oleique, **S** = stéarique, **P** = palmitique)

CONCLUSION

La valorisation de la margine par une souche sauvage de *Yarrowia lipolytica* montre que cette levure se développe mieux sur un volume de 150 ml de margine à pH 6 dans un erlenmeyer de 1 litre.

Les sucres et les lipides dans les margines ont été quasiment consommés par la levure qui les a utilisés comme source de carbone, ce qui réduit le pouvoir polluant de ces effluents.

L'activité lipolytique obtenue sur un volume de 150 ml à pH 6 est plus importante (UL/ml = 8,35) comparée à celle obtenue sur le même volume mais à

un pH 5 (UL/ml = 5,54). Elle n'a pas présenté une augmentation accrue durant la croissance puisque *Yarrowia lipolytica* est dérivée d'une souche sauvage.

L'addition de l'ion Mg^{2+} dans un volume de 150 ml à pH 6 n'a pas stimulé l'augmentation de la quantité des lipases produite par la levure, ceci reviendrait à la nature de la souche de *Yarrowia lipolytica* et aussi à la richesse des margines par cet ion.

L'activité lipolytique maximale a été déterminée à une température de 42,5°C et au pH 6,75 suite à un plan d'expérience complet à 3 niveaux.

La spécificité de l'enzyme a été déterminée par l'hydrolyse des triglycérides dans les huiles d'olive et de soja ; les résultats obtenus montre que cette dernière hydrolyse de préférence la trioleine et la di-oleil-linoleil du glycérol.

Pour optimiser la valorisation des margines, il serait souhaitable de :

- Utiliser d'autres souches de levures ayant la capacité de produire des quantités plus importantes de lipases.
- Purifier et caractériser les lipases obtenues afin de déterminer leurs activités spécifiques ainsi que leurs propriétés physico-chimiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- HOU, C. T., 1997. Characterization of new yeast lipases. *Journal of Oil Chemist's Society*, 74 (11) : 1391-1394.
- DAGGA, F. et ABU BÖHMER, B., 1993. Hazardous olive-mill wastewater problem and solution. (<http://www.euro-arab.com/studies/english/water/02-0015/02-0015-1.html>).
- DE FELICE, B., PONTECORVO, G. et CARFAGNA, M., 1997. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnology*, 17 (3) : 231-239.
- DESTAIN, J., ROBLAIN, D. et THONART, P., 1997. Lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 2 : 105-107.
- FALCH, E. A., 1991. Industrial enzymes - developments in Production and application. *Biotechnology Letters*, 9 : 643-658.
- PEREZ -CAMPOS, F. et DOMINGUEZ, A., 2001. Factors affecting the morphogenetics switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 43 : 429-433.
- GOMEZ CABRERA, A., PARELLADA, A. et OCANA, F., 1982. Utilization del ramon de olivo en alimentation animal. *Archivos de Zootnia*, 3 : 19-79.
- HADEBALL, W., 1991. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnology*, 11 (2) : 159-167.
- ISONO, Y. H., NABETANI, M. et NAKAJIMA, M., 1995. Lipase-surfactant complex as catalyst of inter esterification and esterification in organic media. *Fermentation Bioengineering*, 80 : 170-175.
- LECOMTE, P., 1998. Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines, Lavoisier (Ed.), Paris : 11-22.
- LEVEAUX, J.Y. et BOUIX, M., 1993. Etude des conditions extrêmes des levures osmophiles : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier (Ed.), Paris : 8-10.
- MEBIROUK, M., 2000. Rejets des huileries : Développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine. *CMPP News*, n°11.
- Ministère de l'Agriculture Libanaise, 1999. Statistique agriculture courante, rapport annuel. Beyrouth, Liban.

- NOVOTNY, C. et DOLEZALOVA, L., 1993. Effect of lipids and detergents on the production and solubilization of extracellular lipase. *Folia Microbiology*, 38 (1) : 49-54.
- PAQUOT, M., DELEU, M., BEAUFIS, C. et BLECKER, C., 1996. Electrical micro-environmental influence on the hydrolytic activity of free and immobilized *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology Letters*, 18 (1) : 73-78.
- SCIOLI, C. et DE FELICE, B., 1993. Impiego di ceppi di lievito nella depurazione dei reflui dell'industria olearie ann. *Microbial Enzymology*, 43 : 61-69.
- SCIOLI, C. et VOLLARO, L., 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research*, 31 (10) : 2520-2524.
- ROHIT, S., CHISTI, Y. et BANERJEE, U. C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19 (8): 627-662.